

## 21. Über die Hemmung der Cholin-esterase durch p-Aminobenzolsulfonsäure-amide und Diamine<sup>1)</sup>

von E. Albert Zeller.

(30. XII. 41.)

Es ist eine grosse Gruppe von Hemmungskörpern der Cholin-esterase (ChE) bekannt, die als gemeinsame Eigenschaft eine oder mehrere basische Gruppen aufweisen. Der Hemmungsmechanismus ist wohl so zu deuten, dass diese Stoffe mit der basischen Gruppe an die entsprechende Haftstelle des Fermentes gebunden werden und damit den Zutritt des Acetyl-cholins (ACh) zum Ferment verhindern. Das Ausmass dieser dadurch bewirkten Hemmung hängt neben der Konzentration von Ferment, Hemmungsstoff und Substrat vom Verhältnis der Affinitäten der ChE zum Substrat und zum Hemmungsstoff ab.

Als ein Inhibitor der ChE wurde von Wense<sup>2)</sup> das Histamin erkannt. Histamin ist aber ein Substrat der Diamin-oxydase (DO). Da die beiden Fermente ChE und DO mehrfach miteinander verknüpft sind<sup>3)</sup>, so interessierte die Frage, wie sich andere Substrate der DO gegenüber der ChE verhalten. Als Beispiel wurden Cada-verin (Pentamethylendiamin) und Agmatin ( $\delta$ -Aminobutyl-guanidin) gewählt. Die Guanidingruppe des Agmatins besitzt eine grössere Affinität zur DO als die Aminogruppe der beiden Substrate<sup>4)</sup><sup>5)</sup><sup>6)</sup>, und es sollte ermittelt werden, ob dasselbe auch gegenüber der ChE gilt.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich eine ausgeprägte Affinität der einfachen Aminogruppe zur ChE, was die Verwendung weiterer Amine anregte. Von diesen wurden vor allem die p-Aminobenzolsulfonsäure-amide, im Folgenden einfach als Sulfonamide bezeichnet, herangezogen. Der Mechanismus der therapeutischen Wirkung dieser ausserordentlich wichtigen Heilmittel ist bei weitem noch nicht aufgeklärt. Es ist anzunehmen, dass diese Stoffe die Fermente des Krankheitserregers und des Wirtsorganismus beeinflussen. Die Einwirkung der Sulfonamide auf die ChE bot eine

<sup>1)</sup> Teilweise vorgetragen an der Sitzung des Vereins Schweizer Physiologen Juli 1941; Verh. Schweiz. Physiol. **19**, 35 (1941).

<sup>2)</sup> Wense, Z. Fermentforsch. **15**, 291 (1937).

<sup>3)</sup> E. A. Zeller, Helv. **23**, 1502 (1940).

<sup>4)</sup> Zusammenfassende Darstellung: E. A. Zeller, Diamin-oxydase, Advances in Enzymology, New York 1942 (im Druck).

<sup>5)</sup> E. A. Zeller, Helv. **23**, 1418 (1940).

<sup>6)</sup> E. A. Zeller, Helv. **24**, 539 (1941).

günstige Gelegenheit, die Reaktion zwischen diesem und einem Ferment unter verhältnismässig einfachen Bedingungen zu studieren. Es handelt sich, im Gegensatz zu den meisten bisherigen Versuchen, hier nicht um ein oxydatives, das einen Teil eines grösseren Fermentverbandes bildet, wodurch die Verhältnisse sich ausserordentlich komplizieren, sondern um ein hydrolytisches Ferment. Eine weitere Aminoverbindung, die p-Aminobenzoesäure, die bekanntlich die Wirkung der Sulfonamide auf die Krankheitserreger *in vivo* und *in vitro* aufhebt, wurde in die Untersuchungen einbezogen, um das Verständnis für diese Reaktion von der ferment-chemischen Seite her zu vertiefen.

Bei all diesen Arbeiten zeigte es sich, dass die Hemmungen der ChE durch Diamine, Sulfonamide und p-Aminobenzoesäure qualitativ gleichartig, quantitativ aber ausserordentlich verschieden ausfielen, wenn die ChE verschiedener Organe und verschiedener Tierarten (und des Menschen) verwendet wurde. Diese bis heute kaum behandelte Erscheinung, die von allgemeinerem fermentchemischem Interesse ist, wurde einer eingehenderen Analyse unterzogen. Ein unterschiedliches Verhalten der ChE ist nicht allein schon durch den Wechsel der Aktivität im gleichen Organ, etwa im Blut oder in der Leber, von Tierart zu Tierart möglich, sondern auch durch die Änderung der ChE-Aktivität beim gleichen Tier im Laufe seiner Ontogenese, vor allem bei den durch die Geschlechtshormone bedingten Veränderungen, wo grosse Schwankungen der ChE verschiedener Organe gesetzmässig auftreten<sup>1)</sup>.

### Methodik.

Es wurde die manometrische Bestimmung von *Ammon* verwendet<sup>2)</sup> und jeweils 0,5 cm<sup>3</sup> Serum oder Organextrakt in den seitlichen Anhang der Manometergefässe eingefüllt, in den Hauptaum 0,3 cm<sup>3</sup> Acetyl-cholinchlorid-Lösung (100 mg in 12,5 cm<sup>3</sup>) und die übrigen Lösungen bis zum Volumen 2 cm<sup>3</sup>. Alle Stoffe wurden in Hydrogencarbonat-*Ringer*<sup>3)</sup> gelöst. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das endgültige Volumen von 2 cm<sup>3</sup>. Der Gasraum wurde mit einer Mischung von 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxyd gefüllt. Die Kontrolle der richtigen Wasserstoffionenkonzentration ( $p_{\text{H}}$  7,8) ist nicht nur für die Einhaltung der optimalen Reaktionsverhältnisse notwendig, sondern auch für die Verhinderung von Störungen der Kohlendioxydabgabe aus der Hydrogencarbonatlösung.

<sup>1)</sup> *E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. v. Wattenwyl und R. Wenner, 3. Mitteilung über Beziehungen zwischen Sexualhormonen und Fermenten, Helv. **24**, 962 (1941).*

<sup>2)</sup> *R. Ammon, Arch. ges. Physiol. **233**, 468 (1933).*

<sup>3)</sup> *H. Birkhäuser, Helv. **23**, 1071 (1940).*

In den bisherigen ChE-Arbeiten<sup>1)</sup> wurde die nach 60 Minuten in Freiheit gesetzte Menge von Kohlendioxyd, ausgedrückt in Kubik-millimetern, als Mass für die ChE-Aktivität angegeben, weil die Reaktion bis zu diesem Zeitpunkt annähernd linear ist. In der vorliegenden Arbeit wird eine geringere ACh-Konzentration angewandt, bei der der lineare Verlauf bei Verwendung von Menschenserum nur höchstens während 30 Minuten gewährleistet ist. Es wird deshalb, sofern nicht der ganze Reaktionsverlauf graphisch oder zahlenmässig dargestellt wird, der 30-Minutenwert als Mass angegeben.

Bei einfachen Bestimmungen der ChE verschiedener Organe können die Werte der Versuche ohne Substrat (Leerwert) ohne weiteres von denen mit Substrat (Hauptversuch) subtrahiert werden, weil die ersten nur einen kleinen Bruchteil der letztern ausmachen. Bei reaktionskinetischen Untersuchungen wie bei den vorliegenden braucht es dagegen in jedem Fall eine eingehende Analyse, ob und wie weit dieses einfache Verfahren erlaubt ist. Es kommt etwa besonders in Leberextrakten vor, dass der Leerwert in den ersten 10 Minuten rasch ansteigt, um dann ziemlich konstant zu bleiben oder nur noch langsam zuzunehmen (Fig. 1, Kurve 2). Es handelt sich hier offenbar um die enzymatische Hydrolyse von in dem Organextrakt vorkommendem ACh. Diese Deutung wird dadurch bestätigt, dass Hemmungsstoffe, die die ChE hemmen, auch diesen anfänglichen Anstieg in ähnlichem Ausmass wie die Hauptreaktion beeinflussen (Fig. 1, Kurve 3). Schliesslich werden durch die Dialyse,

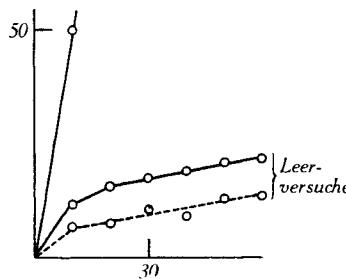


Fig. 1.  
(Versuchs-Nr. G 46)

Rattenleber, 1:5 extrahiert, Acetyl-cholin 0,0066-m., Irgamid 0,0049-m. Abszisse: Minuten, Ordinate: mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd<sup>2)</sup>.

die vorhandenes Acetyl-cholin oder dessen Vorstufen entfernt, diese grössern Leerwerte im allgemeinen wesentlich vermindert. In diesen Fällen mit raschem initialem Anstieg der Leerwerte dürfen die letz-

<sup>1)</sup> Literatur vgl.: E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. v. Wattenwyl und R. Wenner, Helv. **24**, 1465 (1941).

<sup>2)</sup> In Figur 1 bis 4 sind die Versuche ohne Sulfonamide (Irgamid) durch eine ausgezogene Kurve, diejenigen mit Irgamid durch eine gestrichelte dargestellt.

teren nicht einfach von den Hauptwerten subtrahiert werden, sondern nur derjenige Teil, der dem langsamem Anstieg der Kohlendioxydbildung entspricht und auf irgendwelche hydrolytische Prozesse zurückzuführen ist.

Der auf diese Weise graphisch und rechnerisch ermittelte Leerwert wird im Unterschied zum direkt abgelesenen als „reduzierter“ Leerwert bezeichnet. In manchen Fällen sind die Leerwerte so klein ( $0\text{--}3 \text{ mm}^3$ ), dass sie gegenüber den beobachteten Veränderungen keine Rolle spielen und vernachlässigt werden dürfen. Weiterhin muss die Spontanhydrolyse berücksichtigt werden, die ziemlich genau  $1 \text{ mm}^3$  Kohlendioxyd pro 10 Minuten entspricht.

Serum wird mit der erwähnten Hydrogencarbonat-*Ringer*-Lösung verdünnt, die Organe mit Quarzsand verrieben, mit der gleichen Lösung extrahiert und vom Sand mit einem Nesseltuch abgetrennt<sup>1)</sup>.

### 1. Hemmung der Cholin-esterase durch Diamine.

Es wurde in der Einleitung erwähnt, dass die ChE durch Histamin gehemmt wird. Die nachstehende Tabelle 1 zeigt, dass zwei andere Substrate der Diamin-oxydase ebenfalls den enzymatischen ACh-Abbau verringern.

Tabelle 1.  
(Versuchs-Nr. G 46)

Gleiche Ferment- und ACh-Lösung wie Versuch Fig. 1, Cadaverin und Agmatin 0,015-m. Verwendung reduzierter „Leerwerte“ ( $2 \text{ mm}^3$ ).

Minuten	mit Cadaverin				mit Agmatin							
	ohne ACh	mit ACh	Diff.	ohne ACh	mit ACh	Diff.	Proz. Hemmung	ohne ACh	mit ACh	Diff.	Proz. Hemmung	
10	16	60	57	13	49	46	19%	14	49	46	19%	
20	17	105	101	14	88	84	17%	19	94	90	11%	
40	19	182	176	17,5	159	153	13%	23	176	170	3%	
60	25	238	237	23	209	201	11,5%	26	230	222	2%	

Die Hemmung ist bei beiden Diaminen anfänglich gleich gross, um dann beim Agmatin rascher als beim Cadaverin abzunehmen. Die Hemmungsabnahme ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass im Hauptversuch infolge des Verbrauchs des Substrates die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt, während das für die gehemmte Reaktion weniger rasch zutrifft. Die Affinität des Cadaverins zur ChE ist grösser als die des Agmatins, was in einem weiter unten mitgeteilten Versuch mit Menschenserum noch deutlicher erscheint. Die Aminogruppe besitzt also eine grössere Affinität zur ChE als die Guanidingruppe; diese beiden Gruppen verhalten sich somit gerade umgekehrt wie bei der Diaminoxydase. Der Unterschied würde noch deutlicher zutage treten,

<sup>1)</sup> H. Birkhäuser, l. c.

wenn das Agmatin nicht auch noch eine Aminogruppe aufwiese, die ungefähr die gleiche Wahrscheinlichkeit, mit der ChE zu reagieren, wie die Guanidingruppe besitzt.

In der Darmschleimhaut (des Menschen) findet sich eine aktive ChE<sup>1)</sup>, und im Darmlumen können sich nicht unbeträchtliche Mengen von Diaminen durch Eiweissfäulnis bilden. Es ist daher in diesem Organ eine Beeinflussung der ChE durch Diamine denkbar, umso mehr als im obigen Versuch die molare Diaminkonzentration nur doppelt so gross wie die ACh-Konzentration gewählt werden musste, um eine deutliche Reaktion hervorzurufen.

Ein weiteres Diamin, Vitamin B<sub>1</sub>, das mit der Diamin-oxydase wohl reagieren, aber von diesem Ferment nicht abgebaut werden kann<sup>2)</sup>, wurde schon von Süllmann und Birkhäuser<sup>3)</sup> untersucht. Die Autoren stellen eine beträchtliche Affinität zur ChE fest. Ein Versuch mit diesem Körper wird weiter unten (Abschnitt 5) mitgeteilt.

## 2. Hemmung der Cholin-esterase durch Irgamid.

Aus dem vorangehenden Abschnitt geht hervor, dass die Aminogruppe aliphatischer und heterocyclischer Verbindungen eine beträchtliche Affinität zur ChE besitzt. Es war deshalb zu erwarten, dass auch eine an den Benzolring gebundene Aminogruppe die gleiche Eigenschaft aufweisen würde. Fig. 2 bestätigt diese Annahme; denn es wird der ACh-Abbau in beträchtlichem Ausmass gehemmt, wenn ein Derivat des p-Aminobenzolsulfonsäure-amids dem Ferment zugesetzt wird.

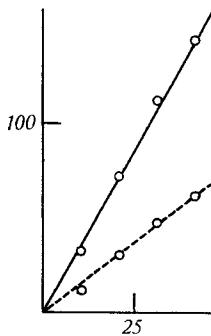


Fig. 2.  
(Versuchs-Nr. G 21)

Menschenserum 1:6 verdünnt, Irgamid 0,0049-m., ACh 0,0066-m., Abszisse: Minuten,  
Ordinate: mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd.

<sup>1)</sup> H. Langemann, Diss. Basel 1941 (im Druck).

<sup>2)</sup> E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, Helv. **22**, 837 (1939).

<sup>3)</sup> H. Süllmann und H. Birkhäuser, Schweiz. med. Wschr. **69**, 648 (1939).

Die verwendete Verbindung, N-Dimethylacroyl-p-aminobenzolsulfonsäure-amid<sup>1)</sup>, die wir im Folgenden der Einfachheit halber mit der Handelsbezeichnung Irgamid anführen<sup>2)3)</sup>, wurde u. a. deshalb aus der grossen Zahl der heute zur Verfügung stehenden Sulfonamide ausgewählt, weil die ChE-Hemmung deutlich ausgeprägt ist und weil das  $p_H$  ihrer Lösung ungefähr dem der Fermentlösung entspricht. Da die Konzentration des Irgamids im vorliegenden Versuch etwas kleiner als die des Acetyl-cholins ist und die Hemmung mehr als 50 % beträgt, ist die Affinität des Sulfonamidabkömmlings etwas grösser, größenordnungsgemäss ungefähr gleich gross wie die des ACh.

Es interessiert in diesem Zusammenhang die Frage, ob Irgamid und ähnliche Stoffe in den Konzentrationen, wie sie bei der therapeutischen Anwendung im Organismus vorkommen (bis zu 20 bis 30 mg %), eine messbare Wirkung ausüben. Die Konzentration des Irgamids im Versuche Fig. 2 (115 mg %) liegt noch wesentlich über den praktisch vorkommenden. Doch lässt sich, wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, auch bei Konzentrationen von 10—30 mg % noch ein deutlicher Einfluss nachweisen.

Tabelle 2.

ACh-Konzentration 0,0066-m., die reduzierten Leerwerte subtrahiert. Es sind die Werte nach 30 Minuten Reaktionsdauer angegeben.

Nr. des Versuchs	mg % Irgamid	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ohne Irgamid	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> mit Irgamid	% Hemmung
G 69	11	53	45,5	14%
G 96	18	95	85	10,5%
G 98	24	88	70	20%
G 100	12	86	76	11,5%

In einer früheren Mitteilung<sup>4)</sup> wurde gezeigt, dass die Bildung eines melaninähnlichen Pigments beim enzymatischen Abbau von Histamin durch Irgamid verhindert wird. Es liegt also mit der ChE ein weiteres Ferment des Basenstoffwechsels vor, das durch Sulfonamide beeinflusst wird.

### 3. Hemmung der Cholin-esterase durch p-Aminobenzolsulfonsäure-amid und einige Derivate desselben.

p-Aminobenzolsulfonsäure-amid, der Grundkörper der therapeutisch verwendeten Klasse der Sulfonamide, besitzt eine mess-

<sup>1)</sup> Für die Überlassung von Irgamid und p-Aminobenzolsulfonsäure-amid spreche ich der Firma *J. R. Geigy & Co. A.G.* in Basel auch an dieser Stelle meinen Dank aus.

<sup>2)</sup> D. Högger, Schweiz. med. Wschr. **71**, 901 (1941).

<sup>3)</sup> N. Markoff, Schweiz. med. Wschr. **71**, 904 (1941).

<sup>4)</sup> P. Robert und E. A. Zeller, Schweiz. med. Wschr. **71**, 1605 (1941).

bare Affinität zur ChE, nachgewiesen durch die deutliche Hemmung des enzymatischen Abbaues von ACh (Tabelle 3).

Tabelle 3.  
(Versuchs-Nr. G 94)

Menschenserum 1:6 verdünnt, ACh 0,0066-m., p-Aminobenzolsulfosäure-amid 0,003-m.  
Angabe der Zahl der gebildeten Kubikmillimeter Kohlendioxyd.

Minuten	ohne p-Aminobenzolsulfosäure-amid		mit p-Aminobenzolsulfosäure-amid		
	Leer-versuch	Haupt-versuch	Leer-versuch	Haupt-versuch	Hemmung
10	3	69	0	53	23%
20	4,5	122	2	101	17%
30	5,5	171	2	142	17%
60	2,5	245	3	203	17%

Wie der Grundkörper, so reagierten fast alle untersuchten Sulfonamide mit der ChE, wobei kleine Unterschiede in der Struktur einen grossen Einfluss hinsichtlich der hemmenden Wirkung auf das Ferment zur Folge hatten. In der Tabelle 4 sind einige als Chemotherapeutica bekannte Stoffe angeführt worden.

Tabelle 4.  
Menschenserum 1:6 verdünnt, ACh 0,0066-m., Sulfonamide 0,0025-m.

Versuchs-Nr.	Sulfonamid	Formel	Hemmung
G 96	p-Aminobenzolsulfosäure-amid	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\cdot\text{NH}_2$	- 1%
„	Irgamid	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)_2$	13%
„	Cibazol	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{C}(\text{CH}_3)=\text{S}\text{---CH}=\text{N}$	18%
G 117	Septazin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\cdot\text{NH}_2$	9%
„	Albuqid	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$	8%

Die Grösse der Affinität zur ChE geht unmittelbar aus der Grösse der Hemmung hervor. Cibazol beeinflusste in mehreren Versuchen die ChE etwas stärker als Irgamid. Die Affinität zur ChE ist aber bei diesen beiden Sulfonamiden nicht wesentlich verschieden.

#### 4. Hemmung der Cholin-esterase verschiedener Organe und Tierspezies.

Um sicher zu sein, ob die an Menschenserum gewonnenen Erfahrungen auch für die ChE anderer Organe gelten, wurde die Einwir-

kung von Irgamid auf die Nieren- und Leber-ChE des Menschen untersucht. Das Ergebnis ist in Fig. 3 dargestellt worden.

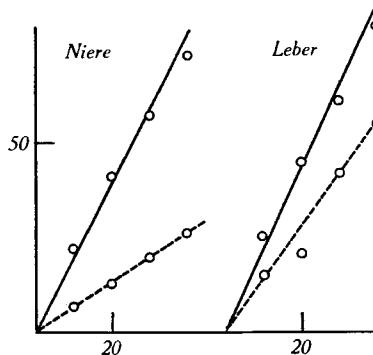


Fig. 3.  
(Versuchs-Nr. G 54/55)

Menschen-niere und -leber 1:5 mit Hydrogencarbonat-Ringer extrahiert. ACh 0,0066-m., Irgamid 0,0045-m., Abszisse: Minuten, Ordinate: mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd.

Unter den Bedingungen des Versuches Fig. 3 wurde die Nieren-ChE um 69 %, die Leber-ChE um 31 % gehemmt. In einem gleichartigen Versuch mit Menschen-serum wurde eine Hemmung von 47 % festgestellt (Versuch G 46). Es finden sich somit deutliche Unterschiede je nach der Herkunft der ChE.

Noch grössere Unterschiede der ChE-Hemmung ergaben sich, wenn nicht die ChE verschiedener Organe derselben Spezies, sondern die ChE des gleichen Organes verschiedener Spezies verwendet wurde. So ist beim Rinderserum, das wegen seiner geringen ChE-Aktivität nicht verdünnt wurde, mit einer Irgamidkonzentration, die mit Menschen-serum eine 50-prozentige Hemmung bewirken würde (0,0049-m.), überhaupt kein Einfluss bemerkbar. Nach 30 Minuten wurden 63 mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd bei Anwesenheit von Irgamid, 62 mm<sup>3</sup> im Kontrollversuch gebildet (Versuch G 29). Man gelangt zum gleichen Resultat, wenn das Serum in üblicher Weise verdünnt wird.

Pferdeserum hält die Mitte zwischen Menschen- und Rinder-serum. Ein Hemmungsversuch mit diesem Serum ist in Tabelle 5 dargestellt.

Durch die Dialyse wird die Geschwindigkeit des ACh-Abbaues in Anwesenheit von Irgamid nicht wesentlich verändert, wohl aber die des Kontrollversuchs erhöht, so dass die Hemmung deutlich grösser wird.

Besonders eindrücklich ist das Verhältnis von Menschen- zu Meerschweinchenserum, weil die ChE-Aktivität bei beiden ungefähr die gleiche ist. Trotzdem wird bei einer bestimmten Irgamidkonzen-tration die ChE des erstern um 46 %, die des letztern nur um 13 % gehemmt (Fig. 4).

Tabelle 5.  
(Versuchs-Nr. G 52/53)

Pferdeserum 1:12 verdünnt, zum Teil 48 Stunden gegen Ringer-Lösung dialysiert. ACh 0,0066-m., Irgamid 0,0053-m. (mit undialysierter Fermentlösung) resp. 0,0049-m. (mit dialysierter Fermentlösung). Die geringen „reduzierten“ Leerwerte subtrahiert.

Zeit	Undialysierte Lösung			Dialysierte Lösung		
	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> mit Irgamid	Hemmung	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> mit Irgamid	Hemmung
10	38	30	21%	50	31	37%
20	76	64	16%	87	60	31%
30	108	91	16%	120	86	28%
60	174	154	12%	188	145	23%

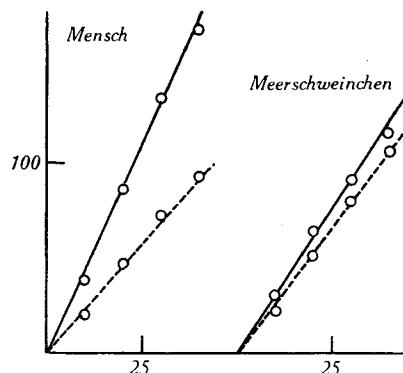


Fig. 4.  
(Versuchs-Nr. G 22/25)

Serum 1:6 verdünnt, ACh 0,0066-m., Irgamid 0,0049-m., Abszisse: Minuten, Ordinate: mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd.

Das Verhalten der Rattenorgane wird in summarischer Weise in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6.

ACh 0,0066-m. Es wird die nach 30 Minuten gebildete Menge von Kohlendioxyd angeführt.

Ver- suchs- Nr.	Organ	Behandlung des Organs	Ver- dünnung	mol. Konz. d. Irgamid	Kontroll- versuch		Irgamid- versuch		Hem- mung
					-	+	-	+	
G 30	Leber	undialysiert	1:10	0,0045	9	59	6	52	10%
31	"	"	1:10	0,0054	16	69	6	56	18%
45	"	"	1:5	0,0049	19	133	11	115	13%
46	"	dialysiert	1:5	"	27	150	13	124	17%
48	"	undialysiert	1:5	"	20	150	13	112	29%
48	Niere	"	1:10	"	4	18	4	17	ca. 5%
51	Leber	dialysiert	1:5	"	10	166	7	127	23%

Das Ausmass der Hemmung ist wesentlich geringer als im Menschenserum und entspricht ungefähr der des Pferdeserums. Auch bei der Ratte scheinen Unterschiede zwischen den ChE verschiedener Organherkunft zu bestehen.

Wir können somit folgende Reihe der Hemmbarkeit der ChE durch Irgamid aufstellen:

Mensch . . . . .	Niere
	Serum
	Leber
Pferd . . . . .	Serum
Ratte . . . . .	Leber
Meerschweinchen . . .	Serum
Ratte . . . . .	Niere
Rind . . . . .	Serum

Um die Frage zu beantworten, ob ähnliche Gesetzmässigkeiten auch für andere Inhibitoren der ChE gelten, wurden die ChE-Hemmungsversuche mit Diaminen, die an Rattenlebern durchgeführt wurden (Tabelle 1), nunmehr mit Menschenserum wiederholt (Tabelle 7).

**Tabelle 7.**  
(Versuchs-Nr. G 41)

Menschen serum 1:6 verdünnt, Diamine 0,015-m., die sehr geringen und „reduzierten“ Leerwerte subtrahiert.

Minuten	Serum mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	Serum + Cadaverin		Serum + Agmatin	
		mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	Hemmung	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	Hemmung
10	53	24	48%	31	39%
20	105	64	38%	79	28%
30	150	99	33%	117	24%

Die Hemmung im Menschenserum ist offenbar wesentlich grösser, als sie in der Rattenleber gefunden wurde und entspricht der grössten Hemmbarkeit der Menschenserum-ChE durch Sulfonamide. Das Ergebnis bildet eine weitere Stütze für die Annahme der Gleichartigkeit der Diamin- und Sulfonamidhemmung der ChE. Wie beim Versuch Tabelle 1, so ist auch beim vorstehenden die Wirkung des Cadaverins grösser als die des Agmatins.

Es soll hier noch über einige Versuche berichtet werden, die die Ursache dieser Unterschiede der Hemmbarkeit der ChE verschiedener Herkunft aufklären sollten. Es bestehen theoretisch drei Möglichkeiten als wahrscheinlichste zur Diskussion. Der Unterschied könnte durch das Ferment selber bedingt sein, was bedeuten würde, dass etwa Leber- und Nieren-ChE nicht identische Stoffe sind, oder aber durch Begleitstoffe, die niedrig- oder hochmolekularer Natur sein könnten.

Durch Dialyse lassen sich niedermolekulare Stoffe leicht und weitgehend von einem Ferment abtrennen. Aus den schon weiter oben mitgeteilten Versuchen geht hervor, dass im Pferdeserum die Hemmbarkeit verstärkt wird, dass aber in andern Organen kein bedeutender Einfluss der Dialyse erkennbar ist. Jedenfalls hebt sie die bestehenden Unterschiede keineswegs auf. Bei der Menschenleber-ChE führt die Dialyse keineswegs zur grösseren Hemmbarkeit der Nieren-ChE, sondern lässt sie sogar von 41% auf 31% abnehmen (Irgamidkonzentration 0,0049, Versuch G 43/44). Es scheinen somit niedermolekulare Stoffe keine entscheidende Rolle in dieser Frage zu spielen.

Der Einfluss hochmolekularer Stoffe müsste in einem Versuche zutage treten, wenn wir zwei Fermente, die sich gegenüber dem gleichen Inhibitor sehr verschieden verhalten, miteinander mischen. Setzt sich die Hemmbarkeit der Mischung angenähert additiv aus der der Einzelkomponenten zusammen, dann ist ein Einfluss hochmolekularer Stoffe (und damit auch anderer Fermente) höchst unwahrscheinlich. Ein derartiger Versuch ist in Tabelle 8 dargestellt worden.

Tabelle 8.  
(Versuchs-Nr. G 35)

Menschenserum 1:6 verdünnt, Rattenleber 1:10 verdünnt, beide 24 Stunden dialysiert. ACh 0,0066-m., Irgamid 0,0049-m. Angabe der nach 30 Minuten gebildeten Menge Kohlendioxyd.

Ferment	Kontroll-versuch		Versuch mit Irgamid		
	-	+	-	+	Hemmung
Serum . . . . .	1	112	0	56	50%
Rattenleber . . . . .	3	30	1	25	16%
Serum + Leber . . . . .	1	127	3	71	44%

Das Ergebnis des Versuches ist eindeutig und entscheidet für additive Zusammensetzung der Hemmungswirkungen. Serum + Rattenleber müssten  $142 \text{ mm}^3$  Kohlendioxyd bilden, und tatsächlich werden 127 gefunden (Verhältnis 1,12:1). Die Zahlen für den Irgamidversuch sind  $81 \text{ mm}^3$  statt 71, das Verhältnis 1,14:1. Der Versuch mit undialysierten Fermentlösungen führte zum gleichen Ergebnis (Versuch G 34).

Es bleibt somit als wahrscheinlichste Hypothese die Annahme, dass die Unterschiede in der Natur des Fermentes selber begründet sind.

##### 5. Einfluss der p-Aminobenzoësäure auf die Cholinesterase und auf deren Hemmung durch Sulfonamide.

p-Aminobenzoësäure verhindert in vivo und in vitro die Wirkung der Sulfonamide auf die Krankheitserreger. Es lag deshalb

nahe, auch den Einfluss dieses Stoffes auf die ChE zu untersuchen, umso mehr als es sich hier wiederum um ein aromatisches Amin handelt. Beim folgenden Versuch zeigt sich deutlich, dass auch die p-Aminobenzoësäure die ChE zu hemmen und die Irgamidhemmung zu verstärken vermag.

Tabelle 9.

(Versuchs-Nr. G 28)

Menschenserum 1:6 verdünnt, p-Aminobenzoësäure 0,013-m., Irgamid 0,0027-m.  
Angabe der nach 30 Minuten gebildeten Menge Kohlendioxyd.

Inhibitor	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>		Hemmung
	-	+	
—	2	116	—
p-Aminobenzoësäure . . . . .	- 2	92	19%
Irgamid . . . . .	0	69	40%
p-Aminobenzoësäure + Irgamid	7	50	57%

Die Affinität der p-Aminobenzoësäure ist wesentlich geringer als die der meisten Sulfonamide. Im vorstehenden Versuch ist trotz der fünffachen Konzentration die Hemmung nur halb so gross wie beim Irgamid. Der Affinitätsunterschied ist so gross, dass die p-Aminobenzoësäure auch dort, wo sie eine deutlich hemmende Wirkung ausübt, bei der Kombination mit einem Sulfonamid dessen inhibitorische Wirkung nicht immer zu steigern vermag (Tabelle 10).

Tabelle 10.

(Versuchs-Nr. 54)

Menschenniere 1:5 verdünnt, Acetyl-cholin 0,0066-m., p-Aminobenzoësäure 0,0044-m., Irgamid 0,0045-m. Angabe der Menge des gebildeten Kohlendioxyds nach 30 Minuten.

Inhibitor	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>	Hemmung
	+	
—	57	—
p-Aminobenzoësäure . . . . .	29	49%
Irgamid. . . . .	20	65%
p-Aminobenzoësäure + Irgamid	20	65%

Wie die Sulfonamide wirkt auch die p-Aminobenzoësäure auf die Menschennieren-ChE stärker hemmend als auf die irgend eines andern Organes.

Das Problem der Beeinflussung der Sulfonamidhemmung der ChE durch p-Aminobenzoësäure ist ein äusserst umfangreiches, da auch die p-Aminobenzoësäure auf die ChE verschiedener Organe verschieden stark einwirkt. Für seine Behandlung fehlen auch die meisten Grundlagen, da die Einwirkung von mehreren Inhibitoren auf ein Ferment bisher kaum bearbeitet worden ist. Im Anschluss

an diese Versuche wurde diese Frage, die ein allgemeineres ferment-chemisches Interesse beansprucht, in Angriff genommen, worüber später berichtet werden wird.

Vitamin B<sub>1</sub> (Aneurin) hemmt die ChE<sup>1)</sup> und setzt die Toxizität der Sulfonamide herab<sup>2)</sup>. Bei der gleichzeitigen Einwirkung von Irgamid (0,0045-m.) und Aneurin (0,001-m.) summieren sich die hemmenden Wirkungen jedes einzelnen Körpers: Irgamid 47 %, Aneurin 11 %, beide zusammen 53 % (Versuch G 47).

#### Diskussion der Ergebnisse.

Die Sulfonamide besitzen eine beträchtliche Affinität zur ChE. In Menschen serum ist die von Irgamid ungefähr gleich gross wie die des Substrates. Das muss bei der therapeutischen Anwendung dieser Stoffe sich auswirken, weil bei den tatsächlich im Organismus vorkommenden Konzentrationen ein Einfluss auf das Ferment nachgewiesen worden ist. Hierbei ist noch zu berücksichtigen, dass im Blut die ACh-Konzentration mindestens 40mal kleiner (0,00015-m.) ist als die, die in den vorstehenden Versuchen angewandt worden ist (0,0066-m.). Wenn wir anstelle der höchsten ACh-Konzentration, wie sie von *Kapfhammer* angegeben worden ist<sup>3)</sup>, die sehr viel kleineren anderer Autoren berücksichtigen, wird der Unterschied noch entsprechend grösser. Da es sich bei der Einwirkung von Sulfonamiden und ACh auf die ChE um eine Konkurrenzerscheinung handelt, muss demnach die ChE bei den kleinen ACh-Konzentrationen des Blutes entsprechend grösser ausfallen.

Es ist in der Fermentchemie ganz allgemein üblich, die Herkunft des Enzyms bei der Diskussion von Hemmungsversuchen unberücksichtigt zu lassen. Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen zeigt aber, dass diese für den Ausfall der Reaktion sehr wesentlich sein kann. So wird die Rinderserum-ChE durch eine Irgamidkonzentration gar nicht beeinflusst, die bei der Menschen-serum-ChE eine 50-proz. Hemmung verursacht. Es darf deshalb ein Resultat, das mit dem Ferment eines Organes erhalten wurde, nicht einfach auf das eines andern Organes oder gar einer andern Tierart übertragen werden. Insbesondere sollten der Fermentapparat des Menschen und dessen Verhalten gegenüber physiologisch und therapeutisch wirksamen Körpern untersucht werden, wenn ein zuverlässiger Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Stoffe im menschlichen Organismus gewonnen werden soll. Wenn schon die Blut-ChE deutlich durch Sulfonamide gehemmt wird, so ist es durchaus möglich, dass die ChE anderer Organe, etwa gewisser Hirnteile

<sup>1)</sup> H. Süllmann und H. Birkhäuser, l. c.

<sup>2)</sup> A. Jung und M. Ritter, Verh. Schweiz. Physiol. **18**, 25 (1941).

<sup>3)</sup> Zusammenfassung bei M. Guggenheim, Die biogenen Amine, 3. Auflage, Basel 1940, S. 93.

oder gewisser inkretorischer Organe, die alle durch einen bestimmten ChE-Gehalt ausgezeichnet sind<sup>1)</sup><sup>2)</sup>, noch viel stärker beeinflusst wird. Wir sind damit beschäftigt, das Verhalten der ChE solcher Organe gegenüber Sulfonamiden zu untersuchen.

Diese Überlegungen sind unabhängig von der Annahme, die man sich über die Natur der beobachteten Unterschiede machen kann. Aus den bisherigen Versuchen scheint hervorzugehen, dass es nicht Begleitstoffe, sondern die Fermente selber sind, die verschieden reagieren. Als Arbeitshypothese nehmen wir an, dass die Eiweisskomponente des Fermentes an der Art- und Organspezifität der Eiweisskörper teilhat, dass also streng genommen die Leber- und die Serum-ChE chemisch nicht identisch sind. Bei den weitgehend gereinigten Fermenten der Proteasengruppe sind solche Unterschiede immunologisch tatsächlich festgestellt worden<sup>3)</sup>.

#### Zusammenfassung.

1. Cadaverin und Agmatin hemmen die ChE.
2. p-Aminobenzolsulfonsäure-amid und verschiedene therapeutisch verwendbare Abkömmlinge desselben wirken als Inhibitoren auf die ChE.
3. Das Ausmass der Hemmung der ChE durch Diamine und Sulfonamide ist sehr verschieden je nach der Herkunft der ChE (organ- und artspezifisches Verhalten).
4. In gleicher Weise, aber sehr viel schwächer, wirkt die p-Amino-benzoësäure.

Frl. A. Buser danke ich für die ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Physiologisch-Chemisches Institut  
der Universität Basel.

---

## 22. Nitrat-Mischelektrolysen von Adipaten, von Lävulinaten und von $\beta$ -Isoamyloxy-propionaten von Fr. Fichter und John Herndl<sup>4)</sup>.

(1. XII. 41.)

### A. Einleitung.

In dem Bestreben, die Mischelektrolysen fettsaurer Salze mit Nitraten vollständiger auszubauen, wählten wir als weitere zweibasische Säure die Adipinsäure, nachdem Fr. Fichter und Ernst

<sup>1)</sup> H. Birkhäuser, l. c.      <sup>2)</sup> H. Langemann, l. c.

<sup>3)</sup> Northrop, Handbuch der Enzymologie, Berlin 1940, S. 669.

<sup>4)</sup> Auszug aus der Diss. John Herndl, Basel 1941.